

Aus dem Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. G. Wendt

Entwicklung einer Methode zur kombinierten
morphologisch-biochemischen Untersuchung
von Einzellen unter besonderer Berücksich-
tigung der Mikrokinematographie; durchge-
führt an Yoshida-Aszites-Hepatomzellen
(Stamm AH 130)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

EKKEHARD KARL LUDWIG VOLLMER

aus Freiburg/Breisgau

Marburg 1977

Druck: Mauersberger, Marburg

Aus dem Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G.G. Wendt

Entwicklung einer Methode zur kombinierten
morphologisch-biochemischen Untersuchung
von Einzellen unter besonderer Berücksich-
tigung der Mikrokinematographie; durchge-
führt an Yoshida-Aszites-Hepatomzellen
(Stamm AH 130)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

EKKEHARD KARL LUDWIG VOLLMER

aus Freiburg/Breisgau

Marburg 1977

Druck: Mauersberger, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 15.4.1977
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof.Dr.med. F. Neurath
Referent: Prof.Dr.med. H. Oepen
Correferent: Prof.Dr.med. G. Petry

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.o.o. Einleitung und Ziel der Arbeit	1
2.o.o. Materialien und Entwicklung der Methode	3
2.1.o. Morphologisches Instrumentarium	3
2.1.1. Durchströmungskammer	3
2.1.2. Wärmeinkubator	4
2.1.3. Mikroskop	5
2.1.4. Mikrokinematographie	6
2.2.o. Biochemisches Instrumentarium	10
2.2.1. Elektrode	10
2.2.2. Nährlösung	13
2.3.o. Zellmaterial	14
3.o.o. Versuchsdurchführung und Ergebnisse	17
3.1.o. Einbringen der Zellen in die Durchströmungs- kammer	17
3.2.o. Beobachtung des Zellverhaltens in Nährlösungen unterschiedlicher Zusammensetzung und gleichzei- tiger mikrokinematographischer Dokumentation auf Super 8 Film	19
3.3.o. Calciummessungen	27
3.4.o. Mikrokinematographie auf 16 mm Film	32
3.5.o. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	32
3.5.1. Tendenz: Calciumabfall	34
3.5.2. Tendenz: Calciumanstieg	38
4.o.o. Diskussion	41
5.o.o. Zusammenfassung	44
6.o.o. Literaturverzeichnis	46

1.o.o. Einleitung und Ziel der Arbeit

Morphologische Untersuchungen an Einzelzellen erfolgen meist mit Hilfe der Hellfeld-Mikroskopie an fixierten oder vital-gefärbten Präparaten. Das ist für eine Analyse des Zustandes solcher Zellen oft durchaus zweckmäßig. Will man aber die Verlaufsdynamik bestimmter Veränderungen des normalen Zustandes verfolgen, muß man sich anderer Methoden bedienen.

Ein im Routinebetrieb sehr gebräuchliches Verfahren stellt die Phasenkontrast-Mikroskopie nach Zernike dar. Eine andere weniger häufig benutzte Möglichkeit steht mit der von dem Physiker NOMARSKI entwickelten Interferenzkontrast-Mikroskopie zur Verfügung (44); sie vermittelt gleichsam zwischen der Phasenkontrast- und der klassischen Hellfeld-Mikroskopie (9). Da aber die Zelle nur eine begrenzte Anzahl morphologischer Ausdrucksmöglichkeiten hat, läßt sich aus gestaltlichen Veränderungen nicht unmittelbar auf damit verbundene Stoffwechselprozesse schließen. Vielmehr müssen für eine angemessene Interpretation weitere Parameter berücksichtigt werden.

Die Bedeutung des Ionenmilieus für die Beschaffenheit der verschiedensten Zellen ist unbestritten. Alle diesbezüglichen in vitro-Untersuchungen stellen aber nur Vereinfachungen (und z.T. grobe Verfälschungen) der intravitalen Verhältnisse dar. Ihr Ansatz und ihre Bedingungen sollten deshalb klar definiert sein.

Aus verschiedenen Gründen war für unsere Arbeitsgruppe die kontemporäre Kontrolle der Gestaltsqualitäten feinoptisch faßbarer Zellorganellen interessant. Wir wollten deshalb unter Berücksichtigung dieser Aspekte ein Verfahren entwickeln, das mit einer

Kombination morphologischer und biochemischer Untersuchungen
eine definierbare Aussage über das Verhalten von Einzelzellen
ermöglicht.

2.o.o. Materialien und Entwicklung der Methode

2.1.o. Morphologisches Instrumentarium

2.1.1. Durchströmungskammer

Im Rahmen der Zellzüchtung begann man seit etwa 1927 Zellkulturgefäße kontinuierlich mit frischem Nährmedium zu versorgen. Bis zum heutigen Tage wurden zu diesem Zweck eine Vielzahl von Durchströmungskammern entwickelt (1, 16, 48, 2, 34, 50, 26). Eine für alle Verwendungsmöglichkeiten ideale Kammerkonstruktion gibt es aber noch nicht.

Für unsere Untersuchungen variierten wir deshalb eine von Herrn Dipl. Ing. Heunert (Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen) entwickelte Durchströmungskammer (Abb. 5 u. 8). Sie hat einen äußeren Umfang von 4,5 cm x 7,0 cm, einen inneren Durchmesser von 3,2 cm und besteht aus zwei Stahlringen, die durch zwei Zierschrauben zusammengehalten werden und zwischen sich abgepuffert durch Gummiringe zwei runde Deckgläser festhalten (Dicke 0,17 mm ϕ 32 mm), die einen Innenraum von 1 ml begrenzen. Das Gehäuse enthält 2 Bohrungen als Einflußöffnung und 2 Bohrungen durch die der Abfluß geregelt werden kann (alle 4 Bohrungen zur Aufnahme von 17-er Kanülen). Die Kammer bietet den Vorteil der einfachen Handhabung (Montage von Hand, ohne Zange oder sonstige Hilfen), der Einsatzbereitschaft unter dem Mikroskop auch bei Verwendung größter Objektive (100-fach), der Robustheit und der einfachen Säuberung (mit Extran^R). Die Anschaffungs- bzw. Fertigungskosten im Vergleich mit anderen Durchströmungskammern sind minimal.

2.1.2. Wärmeinkubator:

Bei vitalen Zellbeobachtungen ist die Kammertemperatur ein wichtiger Faktor. Vorschläge zu ihrer Regulierung reichen von Heitzischen, über Heizkasten und Klimabox bis zum Hüllthermostaten (1, 30, 38, 68). Nachteil all dieser Geräte ist die schwerfällige Handhabung beim praktischen Einsatz, z.B.:

- a) kein freier Zugang zu dem Komplex Optik-Kammer-Objektstisch;
- b) Mikroskoptrieb nur indirekt über weitere mechanische Übersetzung von außen zu bedienen;
- c) zeitweiliger Hitzestau mit Temperaturgradienten im Gesamtsystem.

Dementsprechend können Manipulationen während laufender Untersuchungen - wie z.B. Wechsel des Objektivs zur Änderung der Vergrößerung, Schärfennachstellen oder ein Verschieben des Kreuztisches - gar nicht oder nur in sehr beschränktem Maße ausgeführt werden.

Alle diese Einschränkungen weist der Warmluft-Inkubator nach DVORAK und STOTLER nicht auf; außerdem belaufen sich die Anschaffungskosten dabei nur auf ca. ein Drittel im Vergleich zu manchem der oben genannten Geräte. Benutzt wurde das Modell ASI-400 (Nicholson Precision Instruments Inc., Bethesda, Md., USA), das einen kräftigen und breiten temperierten Luftstrom über den ganzen Arbeitskomplex leitet. Es arbeitet mit einem Thermosensor (unabhängig von Störungen der umgebenden Raumluft) und einem Doppelthyristor, der kleinste Temperaturänderungen sofort registriert und zurückmeldet. Abweichend von MÖLLRING (50), der eine Temperatureinhaltung von $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ und besser an-

gab, erzielten wir eine Konstanthaltung von $\pm 0,1^{\circ} \text{C}$ (und nicht schlechter!). Überhitzungssicherung und Filterung der angesaugten Luft garantierten einen staubfreien und geräteschonenden Untersuchungsgang. Die Maximalleistung beträgt ca. 800 W.

2.1.3. Mikroskop:

Für den Gebrauch einer Durchströmungskammer und der darin möglichen Sedimentation der zu untersuchenden Zellen bietet sich die Benutzung eines Mikroskopes "umgekehrter Bauweise" an. Uns stand das Leitz-Diavert-Mikroskop mit FSA-Tubus zur Verfügung, das sich in Anbetracht der später noch zu besprechenden Mikrokinematographie-Ausrüstung als vorteilhaft erwies. Da die Untersuchungen an vitalen, ungefärbten Einzelzellen unter Filmkontrollen erfolgen sollten, wurde der Objektrevolver mit fest eingebauten Durchlicht-Interferenz-Kontrast-T-Objektiven (NP1 P 25/o,5o; NP1 P 4o/o,65; NP 1 P Öl 1oo/1,3o) und Phasenkontrastobjektiven (Phaco 1o/o,25 und Phaco Pl Apo Öl 1oo/1,32) bestückt. In den zugehörigen Interferenzkontrast-Kondensor wurden die erforderlichen Phasenplatten Nr.1 und Nr. 3 eingesetzt. Zur genauen Führung und Einstellung der Durchströmungskammer wurde ein Objektisch mit Teilungen und Nonien in x- und y- Achse verwandt. Als Beleuchtung diente ein "Lampenhäus 1oo" mit Halogen-Glühlampe (12 V, 1oo W) und entsprechendem Transformator. Diese Gerätekombination gewährleistet noch genügend Licht für die Mikrokinematographie (Super-8 und 16-mm) und erreicht außerdem die für Farbaufnahmen (ohne zusätzliche - lichtschluckende - Konversionsfilterung benötigte

Farbtemperatur zwischen 3100° - 3400° Kelvin, ohne durch Hitzeentwicklung schädigend auf die Zellen einzuwirken. Die Kontrollbeobachtung erfolgte durch ein Okularpaar GF 12,5 xMF.

2.1.4. Mikrokinematographie

Für die morphologischen Voruntersuchungen wurde eine Leicina Special der Firma Leitz-Wetzlar und die dazu erhältliche Mikrokinematographische Einrichtung benutzt, bestehend aus: Halterung, Winkelsucher, Steuergerät ST 10 M, Netz- und Registriergerät NR 10 M, externem Belichtungsanzeiger, Fußschalter, Beleuchtungsschaltrelais, entsprechende Geräteanschluß- und Verbindungsleitungen, Okular GW 6,3, Okular Periplan 10x und Stützen 0,1x. Ihre Vorteile sind ausführlich von STEINBACH (68) beschrieben worden. Die Verwendung von Film anstelle von Einzelaufnahmen hat mehrere Vorteile. Erstens kann auf diese Weise die morphologische Veränderung der untersuchten Zellen laufend kontrolliert und fixiert werden. Zweitens wird im Vergleich zur herkömmlichen Kleinbild-Fotographie die Gefahr der Zellschädigung durch zu hohe Lichtintensität ausgeschlossen. Drittens ist die Gewinnung von Einzelbildern aus den belichteten Filmen wesentlich billiger als die Herstellung primär einzeln aufgenommener Abbildungen.

Für orientierende Erstbeobachtungen bewährte sich die Leicina Special hervorragend; ihre Handlichkeit beim praktischen Einsatz ist ausgezeichnet; außerdem ist der Filmpreis im Vergleich zu anderen Formaten minimal. Leider sind für das Format Super-8 nur in sehr beschränktem Umfang unterschiedliche Filme erhältlich; und zwar ausschließlich aus Umkehrmaterial (meist als Colorfilm;

Schwarzweißfilme sind im Handel nur sehr umständlich zu erhalten). Dagegen ist für das 16 mm Format jegliche Art von Filmmaterial leicht zu beschaffen.

Für unsere Versuche benutzten wir Schwarzweiß-Negativ-Filme. Daraus ergeben sich folgende Einschränkungen: Das ohnehin schon sehr kleine Format Super-8 läßt die Herstellung von Einzelpapierbildern nicht zu. Gedruckte Wiedergaben solcher Aufnahmen bringen unbefriedigende Resultate. Das hat zur Folge, daß der Super-8 Film wenigstens zur Zeit noch Informationen nur innerhalb eines kleinen Personenkreises vermitteln kann.

Um dies auszugleichen, die Vorteile der Leicina Special und ihrer dazuentwickelten Mikrokinematographischen Einrichtung aber beizubehalten, setzte ich mich zuerst mit Herrn Ing. Heunert (Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen) und der Bolex GmbH (Ismaning bei München) in Kontakt. Die Firma Leitz-Wetzlar bot nämlich einige Halterungen und Adapter für 16 mm Bolex Filmkameras zur Benutzung in Verbindung mit Leitz Geräten an. Es lag deshalb nahe, eine vorhandene 16 mm Bolex Filmkamera HR 16 umzubauen und an das Mikrokinematographische System der Leicina Special zu koppeln (30, 67, 5) - zumal der Informationsgehalt des 16 mm Filmes auf jedenfall den von Super-8 Filmen übertrifft, während der erhöhte Lichtaufwand zwar 3-fach so hoch ist, aber mit der oben beschriebenen Mikroskopbeleuchtung unterhalb der Grenze bleibt, jenseits derer das Untersuchungsgut (= Einzelzellen) geschädigt werden (26, 68).

Da aber das Leicina Special System ganz auf elektronischer Basis und ein für den Bolex HR 16 Motor von der Firma Robot adaptierter Impulsgeber ganz auf mechanischer Grundlage (mit Hilfe eines Elektromagneten) arbeitet, erwies sich auch nach Rücksprache

mit Herrn Dr. Müller, Institut für Elektronik der Universität Marburg, ein Umbau als nicht praktikabel.

Zur gleichen Zeit entwickelte die Firma Bolex ein neues Kameramodell (H 16 EL) , das mit Belichtungsmessung durch das Objektiv (wie bei der Leicina Special) und ebenfalls auf elektronischer Basis arbeitet. Herr Ing. Kranz (in Hamburg), der schon maßgeblich an der Konstruktion des Leicina Special Systems beteiligt war, adaptierte mir die 16 mm Bolex H 16 EL Filmkamera durch Umbau des Modells und völlige Neukonstruktion eines Netz- und Registriergerätes NR 10 M/H 16 EL analog dem der Leicina Special. Das Steuergerät ST 10 M, das Beleuchtungsschaltrelais und das andere Systemzubehör (s.o.) konnten ohne Änderung übernommen werden. Damit war ein vollwertiges, austauschfähiges System für beide Filmformate geschaffen!

Die beiden Filmkameras (Leicina Special und Bolex H 16 EL) laufen in ihren Halterungen auf einer prismatischen Schiene der photographischen Einrichtung Aristophot (Leitz-Wetzlar) mit dazugehöriger Anschlußleiste. Die Bolexhalterung wurde an einem nach meinen Vorstellungen eigens dafür gebauten Spezialmetallgestell (s.Abb. 1) schwingungsfrei über dem Mikroskop in der Wand verankert (Herstellung und Montage durch Mitarbeiter der Werkstätten des Physikalischen Instituts der Universität Marburg). Bei der Verankerung wurde die exakte Beibehaltung der Achse des gesamt optischen Systems (=Kamera und Mikroskop) beachtet und im Hinblick auf eventuell vorhandene Schwingungen im System ein Aufsitzen der Kamera auf dem Mikroskop vermieden (29). Trotz einer von der Firma Leitz gelieferten schwingungsabsor-

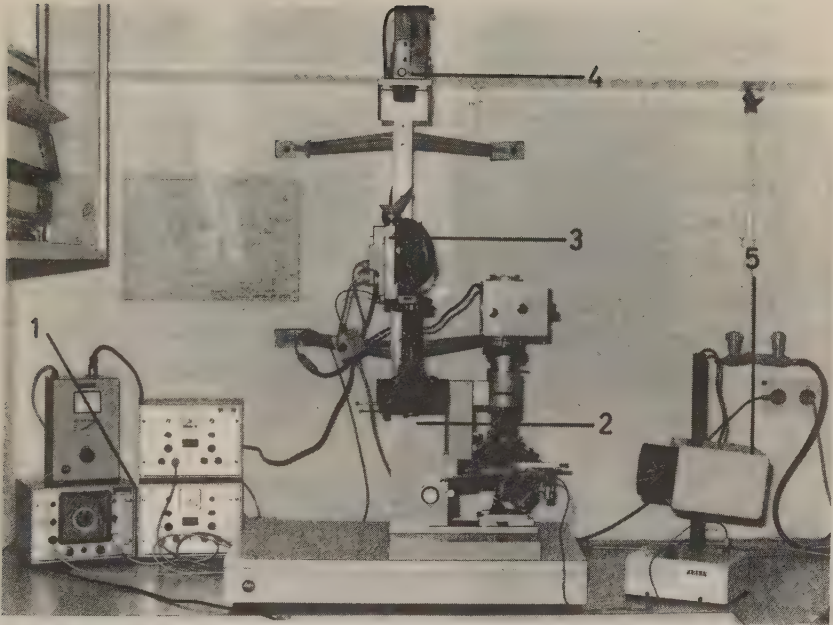


Abb. 1 Mikrokinematographischer Arbeitsplatz

- Legende:**
- 1. Schalt-, Registrier- und Netzgeräte
 - 2. Diavert Mikroskop
 - 3. Bolex H 16 EL
 - 4. Leicina Special
 - 5. Wärmeinkubator

bierenden Grundplatte, auf der das Mikroskop stand, sah ich mich wegen nicht abstellbarer Erschütterungen von außen gezwungen, die Platte zusätzlich mit leichtaufgeblasenen Fahrrad- bzw. Rollerschläuchen zu unterpolstern. Damit gelang es, alle störenden Schwingungen abzufangen.

Ein neues Objektiv (ohne Bezeichnung und Nr.) für die Bolex H 16 EL (anstatt des Stützens 0,1 der Leicina Special) wurde uns von der Firma Leitz-Wetzlar leihweise zur Verfügung gestellt. (Ein entsprechend geeignetes Objektiv für diese Art von Koppelung eines Diavert-Mikroskopes mit einer Bolex H 16 EL wird zur Zeit in Wetzlar für den Vertrieb vorbereitet).

2.2.0. Biochemisches Instrumentarium

2.2.1. Elektrode:

Mc LEAN und HASTINGS haben darauf hingewiesen, daß Calcium nur in ionisierter Form physiologisch aktiv ist (64, 17). Die zentrale Rolle des ionisierten Calciums bei biologischen Prozessen (z.B. der Blutgerinnung, Muskelkontraktion, Herz- und Darmfunktionen, neuromuskulären Erregbarkeit, allgemeinen Membranpermeabilität) bedarf zweifellos noch weiterer Klärung (49, 59, 54, 19, 56, 32, 58, 13, 6, 61, 8, 55, 73).

Für unsere Versuche benutzten wir die von SCHINDLER und RIE-MANN (62, 66) entwickelte Ca^{++} -selektive Scheibenelektrode für Durchflußmessungen, die als einzige der uns bekannten Ca^{++} -Elektroden die Gewähr für eine zuverlässige, robuste und exakte Handhabung bot.

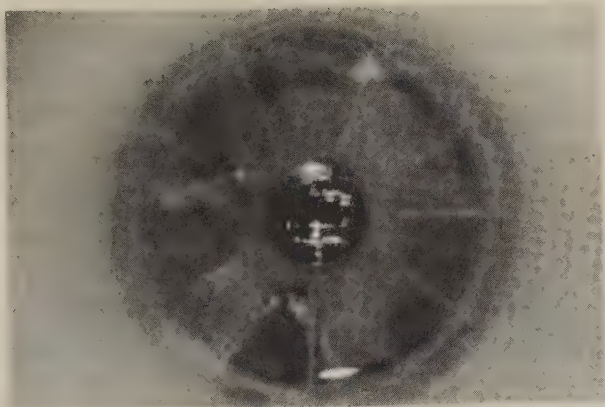


Abb. 2 Ionenselektives Polymer der benutzten Elektrode

Sie hat eine Anzeigegeschwindigkeit von nur ca. 30 sec/Aktivitätsdekade und mißt reproduzierbar mit kleinsten Mediummengen (weniger als 3 μ l Füllvolumen der Durchflußkammer) bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 30 μ l/min.

Die folgenden quantitativen Elektrodenkennzahlen zeigen die Selektivitätsverhältnisse der Elektrode an (61):

$K_{Ca - H}$	$6,2 \times 10^2$
$K_{Ca - Na}$	$9,5 \times 10^{-3}$
$K_{Ca - K}$	3×10^{-4}
$K_{Ca - NH_4}$	$3,5 \times 10^{-2}$
$K_{Ca - Mg}$	$1,8 \times 10^{-3}$
$K_{Ca - Ca}$	1

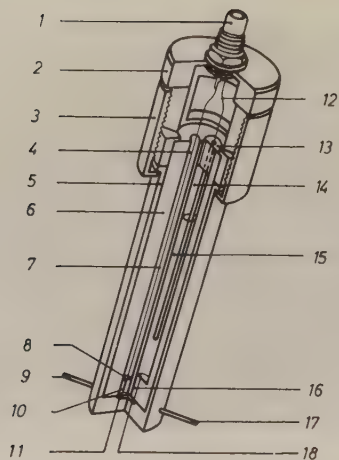


Bild 1. Scheiben-Elektrode

- 1 Amphenolstecker®
- 2 Elektrodenkopf
- 3 Überwurfmutter mit Bajonettverschluss
- 4 Durchführungskanal für versilberte, PTFE-isolierte Kupferlitze
- 5 Verlängerter Kunststoffmantel der abnehmbaren Durchflußkammer
- 6 Elektrodenkörper aus PTFE
- 7 Versilberte, PTFE-isolierte Kupferlitze
- 8 Acrylglas-Ummantelung des Platindrahtes
- 9 Meßkammerfuß
- 10 Platindraht zur Potentialableitung vom scheibenförmigen Sensor
- 11 Scheibenförmiger Sensor
- 12 Versilberte, PTFE-isolierte Kupferlitze
- 13 Deckplatte der Bezugslösungsvorratskammer aus Acrylglas mit Durchführungen für die Bezugselektrode und den Zuleitungsschlauch für die Bezugslösung
- 14 Vorratskammer für die Bezugslösung
- 15 Bezugslösung
- 16 PTFE-Stopfen mit Mikrokerbe oder verschweißte PTFE-Membran mit Mikroleck
- 17 Meßkammerabfuß
- 18 Wannenförmige Durchflußkammer

Abb. 3 Ca^{++} -selektive Scheibenelektrode für Durchflußmessungen nach SCHINDLER und RIEMANN (62).

2.2.2. Nährlösung:

Als Nährmedium wurde eine "physiologische" Salzlösung benutzt, die alle Ionen (Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++}) enthält, welche von EAGLE, RINGER, THYRODE, LOCKE und anderen als essentiell für das Wachstum von Säugetierzellen erkannt und beschrieben wurden (4, 60).

Unsere Lösungen enthielten pro Liter:

- 1) 150 mVal NaCl
4 mVal KCl
0,9 mVal MgCl_2
4 mVal CaCl_2
- 2) 150 mVal NaCl
4 mVal KCl
0,9 mVal MgCl_2
2 mVal CaCl_2

Zur Lösung der Salze (Fa. Merck, Darmstadt) wurde entionisiertes Wasser benutzt. Die so angesetzten Nährlösungen konnten auch zur Elektrodeneichung benutzt werden (63). Unter den gewählten Modellbedingungen wurde auf den Zusatz von Proteinen verzichtet, um die Messbarkeit der Calciumwerte nicht durch Konkurrenzreaktionen von Protonen und Calciumionen an den freien Valenzen der Proteine zu beeinträchtigen.

Es wurde darauf geachtet, daß der pH-Wert zwischen 7 und 7,4 lag. Im Folgenden wird eine Salzlösung mit 4 mVal Calciumchlorid als E IV und eine andere mit 2 mVal Calciumchlorid als E II bezeichnet. Ein wie E II als Kontrolllösung eingesetztes EAGLE's

Nährmedium (der Behringwerke Marburg) wird durch ein E symbolisiert.

2.3.o. Zellmaterial

Die Untersuchungen sollten, wie erwähnt, an Einzelzellen in einer Durchströmungskammer erfolgen. Wegen ihrer problemlosen Handhabung erwiesen sich dafür Yoshida-Aszites-Hepatomzellen vom Stamm AH 13o als geeignet, der mir freundlicherweise von Herrn Doz.Dr. Gericke (Abteilung für Krebsforschung der Firma Höchst Frankfurt/Main) überlassen wurde.

Dieser Stamm wurde 1943 von YOSHIDA in Anlehnung an den Ehrlich-Aszites-Tumor, der 1932 von LOEWENTHAL und JAHN vom Ehrlich-Carcinom der Maus in Aszitesform überführt wurde, gewonnen. Durch Füttern einer Ratte mit Azoverbindungen und Pinselung mit Fowlerscher Lösung auf dem Rücken des Tieres entstand das "Yoshida-Sarkom". Dieser Tumor trat von Anfang an in der aszitischen Form auf. Das Experiment war einmalig; wiederholte Versuche, denselben Tumor noch einmal zu erzeugen, blieben erfolglos (76). Da Aszites-Tumorzellen gewissermaßen selbst ein flüssiges Kulturmedium darstellen, bieten sie sich geradezu als ein Werkzeug zur experimentellen Zellforschung an (42).

Die problemlose Züchtung der AH 13o Zellen in vivo (im Gegensatz zu vielen in vitro-Kulturen) erfolgte im Abdomen 12o-25og schwerer männlicher Albino-Ratten vom Stamm Wistar AF/Han. (bezogen vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover). Die Transplantation des Tumors erfolgte unter sterilen Kautelen zwischen dem 6.-1o. Tag p.i. durch Entnahme von Aszitesflüssigkeit über

die hintere Schenkelfaszie des Tiers, danach Verdünnung im Verhältnis 1 : 10 mit 0,9% NaCl und anschließender intra-peritonealer Injektion von 0,5 ml $\pm$ 5 Millionen Zellen in eine gesunde Ratte (22). Dabei wurden Einmalkanülen und -spritzen verwandt.

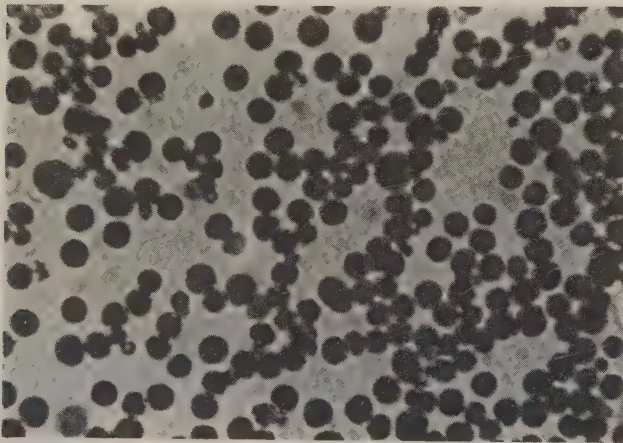


Abb. 4 Ausstrich von AH 130 --- "single cells" (Giemsa)

Der Zellstamm AH 13o weist sehr schöne "single cells" auf (s. Abb. 4 - s. auch 23). Eine schonende Einbringung der Zellen in die Beobachtungskammer ohne Trypsinierung, mechanische Zellablösung von der Unterfläche der Kulturgefäße und andere Manipulationen ist bei diesem Vorgehen gewährleistet.

3.o.o. Versuchsdurchführung und Ergebnisse

3.1.o. Einbringen der Zellen in die Durchströmungskammer:

Zwischen dem 8.-12. Tag nach Tumortransplantation wurde den Ratten zellhaltiger Aszites entnommen (s. Abschnitt 2.3.o.). Zu diesem Zeitpunkt beträgt die Zellzahl ca. 50 Millionen/ml Aszitesflüssigkeit (21). Sie wurde in 37° C warmes Nährmedium gebracht und derart verdünnt, daß sich noch ca. 1,25 Millionen Tumorzellen in 1 ml Flüssigkeit befanden. Von der so gewonnenen Flüssigkeit (Aszitestumorzellen + Nährmedium) wurde durch eine Einmalspritze mit 17er-E-Kanüle und unter Vermeidung von Luftblasen die vorgewärmte Durchströmungskammer gefüllt, die ebenfalls mit einer 17er-E-Kanüle zum Entweichen der Luft bestückt war. (Abb. 5). Danach wurde die Kammer zur Beobachtung und zum Filmen unter das Mikroskop gelegt.

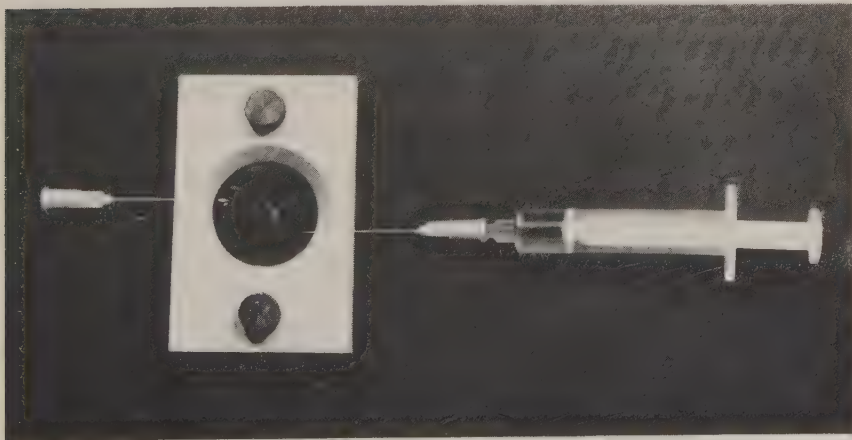


Abb. 5 vorsichtiges Füllen der Kammer

Von der Zellentnahme aus der Ratte bis zum Zeitpunkt der Film- bzw. Ca^{++} -Meßbereitschaft vergehen 5 min. Von da an wird in entsprechenden Abständen gefilmt bzw. gemessen (die jeweiligen Zeitabstände werden bei der Besprechung der einzelnen Versuche dargestellt). Die Innentemperatur der Durchströmungskammer wird auf 37°C gehalten durch Aufstellen des oben erwähnten Wärmeinkubators im 20 cm Abstand vom Diavert-Mikroskop (50). Der Luftstrom bläst in einem Neigungswinkel von ca. 25° auf den Komplex von Objektiv, Kammer, Objektisch und Kondensor. Der Sensor zur Temperaturrückmeldung an den Inkubator wird mit einem Leukoplaststreifen auf der Durchströmungskammer befestigt. Gleich daneben zur Ersttemperatureinstellung und laufenden Kontrolle wird ein Präzisionsthermometer angebracht, das die Kammeraußentemperatur von 39°C (wegen des von außen nach innen auftretenden Temperaturgradienten) anzeigt (51).

Ausführliche Voruntersuchungen über die Durchströmungsverhältnisse in der benutzten Kammer unter Verwendung von wässrigen Medien und von Serum durch SCHÜTE (63) am hiesigen Institut zeigten eindeutige, allerdings recht komplexe Zusammenhänge sowohl hinsichtlich der Durchflußgeschwindigkeiten von Flüssigkeiten, als auch ganz besonders in Bezug auf die verschiedenen Möglichkeiten der Ab- und Zuflußgestaltung durch die 4 vorhandenen Bohrungen in der Kammer. Um bei möglichst einfachen Modellverhältnissen zu bleiben, veranlaßten diese Erkenntnisse bei den anstehenden Versuchen die Kammer nicht als Durchströmungskammer im eigentlichen Sinn, indem die Zellen andauernd und in optimaler Weise mit frischer Nährlösung umspült werden, sondern sie nach Einbringen der Zellen nur noch zur Beobachtung und zur Entnahme kleinster Mengen Flüssigkeit bei der Calciummessung zu benutzen.

3.2.o. Beobachtung des Zellverhaltens in Nährlösungen unterschiedlicher Zusammensetzung und gleichzeitiger mikrokine-matographischer Dokumentation auf Super-8 Film:

Nach Einbringen der ca. 1,25 Millionen Zellen in die Kammer auf die oben beschriebene Art und Weise wurde ihr Verhalten in den Medien E, E II und E IV beobachtet. Die Zellzahl wurde gewählt, weil bei dieser Menge ein Tyndall-Effekt vermieden wird und noch genügend Licht zur später anstehenden 16 mm-Mikrokine-matographie verbleibt (siehe Abschnitt 2.1.3./4, 68); weiterhin war dabei von vorneherein zu erwarten, daß sie ausreichte, um die vorgesehenen Calciummessungen durchzuführen (54, 8).

Die Wahl des geeigneten optischen Systems (Phasenkontrast nach Zernike bzw. Durchlicht-Interferenz-Kontrast-T-Einrichtung nach Nomarski) hängt von verschiedenen Faktoren wie Zellform, Oberflächenbeschaffenheit, Zellbegrenzung, Zellzahl und nicht zuletzt von der Art der Fragestellung ab, ob hauptsächlich Oberflächenphänomene (=Nomarski) oder mehr die Strukturen im Zellinneren (=Zernike) studiert werden sollen (44, 45, 70, 10, 15, 9, 40, 36, 37, 28, 69, 77).

Da die Zellen des Stammes AH 130 von kugeliger Gestalt sind, mit absoluter Zunahme der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kernes (im Vergleich zu normalen Zellen: 43), erweist sich ein Einblick in die Zellinnenstruktur mit Hilfe der Phasenkontrastoptik als sehr unbefriedigend. Ebenfalls durch die Form und Zahl der Zellen, die keine einschichtige Zell-Lage erlaubt, ergibt sich nur ein schlechter Kontrast bei einem großen "Halo-effekt" (s. Abb. 6a u. b).

Deshalb verwendete ich zur Untersuchung der AH 130 Zellen das von Zellform und Dicke der Zell-Lagen unabhängige Nomarski-System. Es vermittelt einen höheren Kontrast mit plastischem, reliefartigem Eindruck für strukturelle Details an der Zelloberfläche wie Plasmabewegung, Pinozytose, Zellfortsätze etc.; dadurch kommt es näher als jedes andere Lichtmikroskop an die Grenze des Auflösungsvermögens heran (70). Weiterhin kann das zu beobachtende Phasenobjekt wahlweise im Schwarzweißkontrast oder aber im Farbkontrast durch Verschieben eines der beiden Nomarskiprismen betrachtet werden. Selbst ein hellfeldähnliches Bild ist durch Herausziehen des Analysators möglich.

— 10 μ

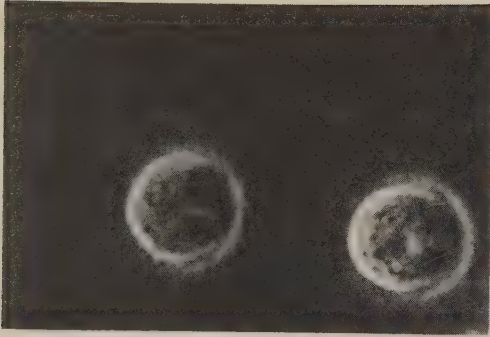


Abb. 6 a: AH 130 im Phasenkontrast

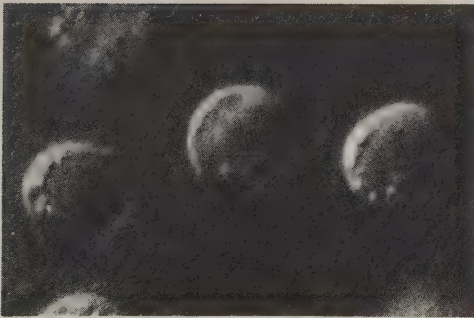


Abb. 6 b: AH 130 im Interferenzkontrast

Um einheitliche und reproduzierbare Voraussetzungen bei der Zellbeobachtung zu haben, wurde für alle anstehenden Untersuchungen immer von einem "Zelltyp" ausgegangen, der folgende morphologische Kriterien bot: Gleichmäßige und kugelige Zellform, faden- bis strahlenförmige Fortsätze, glatte mit nur wenigen spritzerartigen Vesikeln ausgestattete ansonsten ziemlich glatt erscheinende Oberfläche. Bei diesem Zellbild konnte eine intakte noch nicht geschädigte Zelle erwartet werden (33, 65) . Diese Zelle kann zum jeweiligen Zeitpunkt von den morphologischen Kriterien als repräsentativ für die anderen Zellen angesehen werden.

Aufgrund mehrerer Beobachtungsserien und Super-8 Filmstudien (68) bei Ölimmersion (100er Objektiv) ergab sich , daß sich die Zellen in der "stationären Durchströmungskammer" im Milieu unterschiedlicher Nährlösungen (E, E II und E IV) folgendermaßen verhalten (= Bildtafeln I - III).

In E: Die Zellen zeigten nach 100 min einige weitere Vesikel an der Oberfläche und eine nur angedeutete halbmondförmige Vertiefung nach Art einer leichten Einschnürung. Ansonsten bot sich ein relativ unverändertes Zellbild.

In E II: Im Verlauf von 50 min entwickelte sich ein wie oben bei E beschriebenes Bild mit einer etwas schnelleren und häufigeren Vesikelbildung in einem kürzeren Zeitabstand (100 min : 50 min).

In E IV: Schon nach 10 min zeigte sich eine intensive Vesikelbildung und eine deutlichere Einschnürung an der Zelloberfläche als bei E und E II. Die Bläschenbildung ist insgesamt gröber

(bis $1/6$ des Zellvolumens wurde beobachtet). Es erfolgten Ausstoßung von Vesikeln von der Zelloberfläche in das Nährmedium nach Art einer Exocytose. Der Plasmafluß war kräftig ausgebildet. Im weiteren Verlauf wurde das Zellaussehen immer mehr "mondkrater-artig". Nach 50 min zeigten die Zellen eine plumpe durch intensive Vesikelbildung verformte Oberfläche, die völlig von der ursprünglichen Form abweicht. Vertiefungen und Erhebungen an der Zellmembran waren deutlich sichtbar.

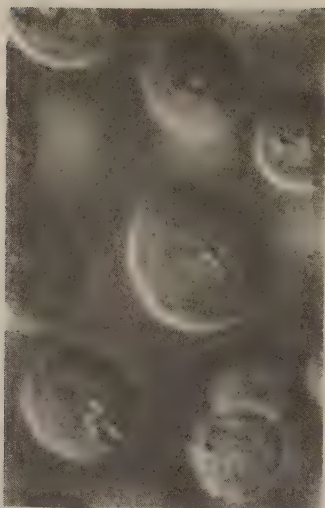
Diese Beobachtungen lassen folgenden Schluß zu:

Obwohl nur eine "stationäre Durchströmungskammer" verwendet wurde, boten die Lösungen E und E II ("physiologischer" Anteil von 2 mVal ionisiertes Calcium) den Zellen ein ausreichendes Medium über einen bestimmten Zeitraum. Es zeigten sich keine morphologisch erkennbaren groben Veränderungen, die als eine veränderte Stoffwechsellage, als Abwehrfunktion oder als Zellschädigung gedeutet werden können (33, 41, 46, 47, 65). Dagegen gab die Flüssigkeit E IV (=eine doppelt so hohe Aktivität des ionisierten Calciums $\hat{=}$ 4 mVal wie "physiologischerweise" $\hat{=}$ 2 mVal) kein adäquates Medium für AH 130 Zellen wie an den oben beschriebenen morphologischen Veränderungen zu sehen ist. Die aufgetretenen Zellveränderungen lassen sich also mit ziemlicher Sicherheit auf den zu hohen Calciumspiegel zurückführen!

Die Super-8 Filmaufnahmen entstanden im 2 min 45 sec Intervall, 15 sec à 18 Bilder $\hat{=}$ 270 Einzelaufnahmen über die oben beschriebenen Zeiträume (39). Die Mikrokinematographie erfolgte sowohl im Schwarzweißkontrast, als auch im Farbkontrast. Es erwies sich für unsere Untersuchungen der Schwarzweißkontrast ausreichend. Getestet wurden folgende Super-8 Filmsorten: Ektachrome 160 (23 DIN), Kodachrome 40 (17 DIN) und Agfachrome (17 DIN); alle

Bildtafel I

10 μ



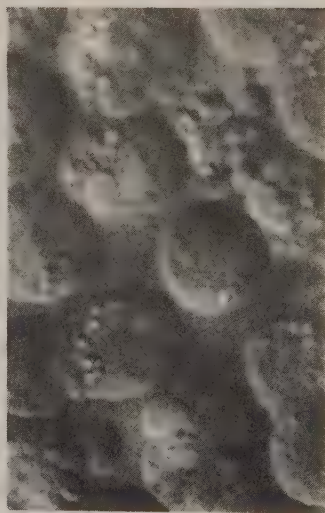
AH 13o: 5 min in E



AH 13o: 5o min in E



AH 13o: 1oo min in E



AH 13o: 5 h in E

Bildtafel II

— 10 μ



AH 13o: 5 min in E II



AH 13o: 5o min in E II



AH 13o: 1oo min in E II



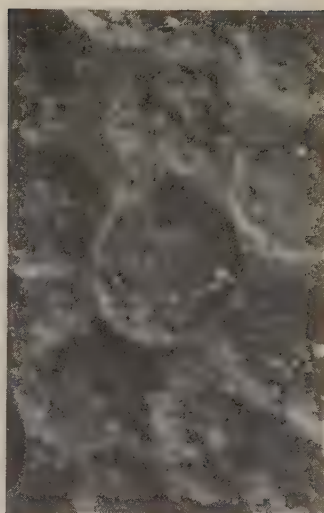
AH 13o: 5 h in E II

Bildtafel III

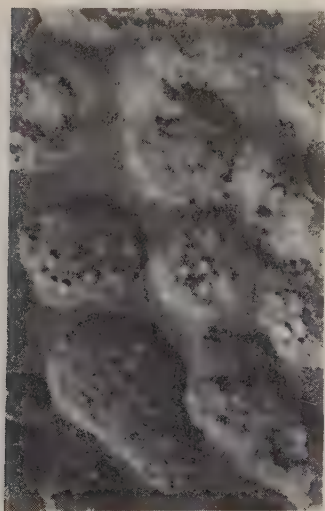
— 10 μ



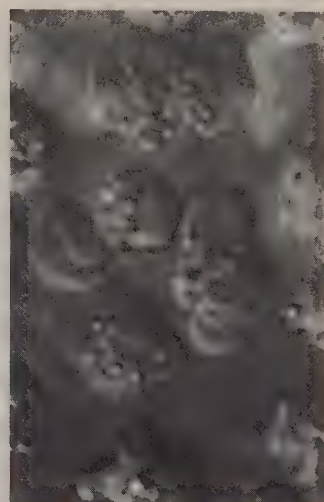
AH 13o: 5 min in E IV



AH 13o: 50 min in E IV



AH 13o: 100 min in E IV



AH 13o: 5 h in E IV

DIN-Angaben für Kunstlicht. Die besten Ergebnisse in puncto Trennschärfe und Auflösungsvermögen bei der Projektion erzielte ich mit Kodachrome 40. Agfachrome und Ektachrome 160 zeigten aber durchaus noch zufriedenstellende Resultate, wobei der letztgenannte Film allerdings mit Kaufpreis und Entwicklung gerechnet, beinahe doppelt so viel wie einer der beiden anderen Filme kostet. Die Entwicklung erfolgte durch Agfa/Kassel und Kodak/Stuttgart bzw. Studio 13.

3.3.o. Calciummessungen:

Nachdem die Feststellung getroffen werden konnte, daß Ca^{++} -Aktivitäten von 4 mVal lichtmorphologisch erfaßbare Veränderungen hervorrufen, wurde mit den Calciummessungen unter gleichzeitiger mikroskopischer Kontrollbeobachtung begonnen. Nach Einbringen der Zellen mit E IV in die Kammer wurde in 5 min bzw. 10 min Abständen gemessen. Dabei ergaben sich die in Abschnitt 3.2.o. beschriebenen morphologischen Veränderungen. Bei den Calciummessungen boten sich bei gleichbleibenden lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen einerseits Meßwerte, die bis max. 5 mVal (meist im Bereich von 2 mVal) über den in E IV vorhandenen Calciumwert reichten; andererseits wurden Werte bis max. 1,5 mVal (meist im Bereich von 0,5 - 0,75 mVal) unterhalb des in E IV vorhandenen Calciums gemessen. Die erhaltenen Werte divergierten am meisten bei 10 min und 55 min, bei 30 min fand sich die größte Annäherung (s. Abb. 7) .

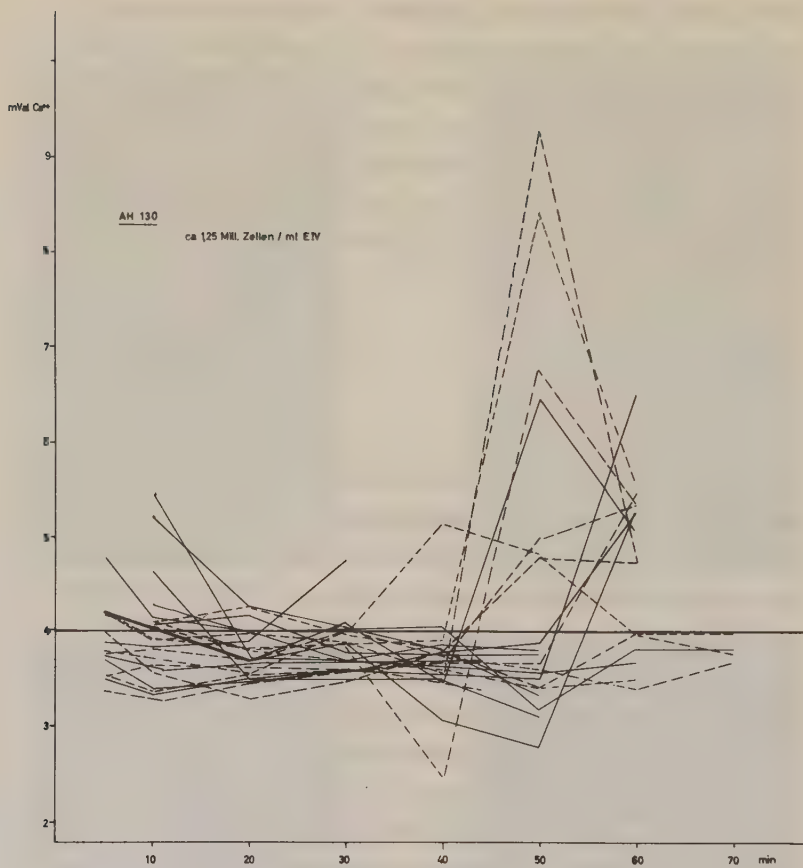


Abb. 7: Calciummessungen bei AH 130

Die Entnahme der zu messenden Flüssigkeit erfolgte in den entsprechenden Zeitabständen in minimalen Mengen (weniger als $3 \mu\text{l}$ Füllvolumen der Elektroden-Durchflußkammer bei 1 ml Inhalt der Durchströmungskammer) über ein Schlauchsystem PVC Nr. 1 und 2 mit Hilfe einer Holter-Roller-Pumpe (Serie 900) der Firma Extracorporeal Medical Specialities Inc. USA) desgleichen das Nachfüllen (s. Schema). Die Messung des ionisierten Calciums erfolgte mit der Ionenselektiven-Calcium-Elektrode nach SCHINDLER und RIEMANN (62, 66) im Durchflußsystem. Die Pumpengeschwindigkeit während der Messung beträgt gleichbleibend 4 ml/h, dabei bleiben die Zellen in der Kammer ruhig liegen, sodaß ein Beobachtung und Mikrokinematographie erschwerendes oder gar ein falsche Calciummeßwerte ergebendes Ausspülen derselben unterbleibt. Nach jeder Messung erfolgt eine Umschaltung mit Hilfe eines eigens dafür hergestellten Dreiwegehahnes auf die Elektrodeneichflüssigkeit (s.Schema in Abb. 8).

Die Veränderungen des Calciumgehaltes werden auf einem Digital-Elektrometer DE 751 (Fresenius Apparatebau Bad Homburg) in mVolt angezeigt und fortlaufend auf einem Servogor RE Kompensationsschreiber Nr. R 12775 (Metrawatt AG) aufgezeichnet. Die Umrechnung von mVolt in mVal erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve auf semilogarithmischem Papier (s.Abb. 10). Der gesamte Meßaufbau befindet sich gegenüber elektrostatischen Aufladungen geschützt in einem geerdeten Faraday Käfig (Abb. 9).

Aufbau zur Messung des Ca^{++} aus einer Durchströmungs- kammer

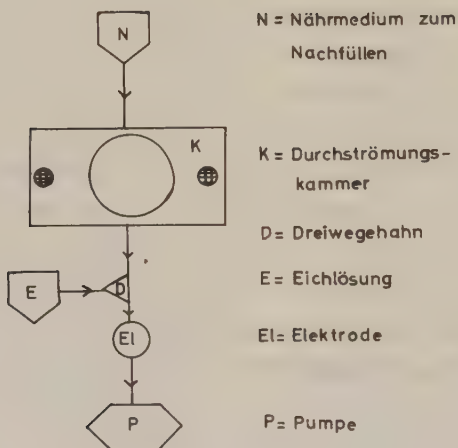


Abb. 8: Schlauchsystem zur Calciummessung (Schema)

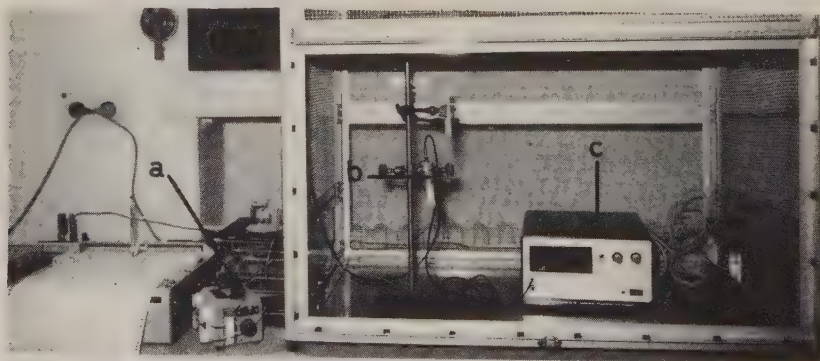


Abb. 9: Meßplatz zur Calciumbestimmung

- a) Schreiber und Pumpe
- b) Elektrode
- c) Elektrometer

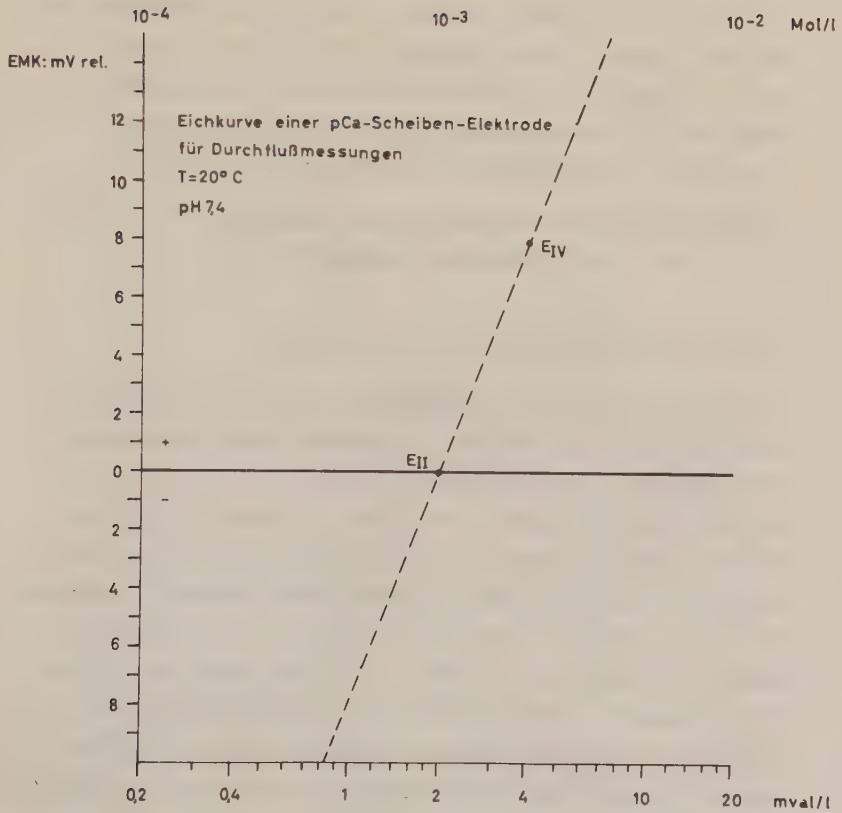


Abb.10: Eichkurve zur Calciummessung

Zur Kontrolle wurde in einem 20 ml Gefäß eine gleichkonzentrierte Zellaufschwemmung gemessen. (Ausführliche Methode s. 4o). Das Gefäß wurde in einem Wasserbad auf konstanter Temperatur von 37° C gehalten. Die Meßergebnisse in der Durchströmungskammer und im Vergleichsgefäß entsprachen einander sowohl bei zunehmender wie abnehmender Calcium-Konzentration.

Insgesamt wurden mit dem Tumor-Aszites-Stamm AH 13o an 13 Ratten 31 Versuche à etwa 12 Messungen durchgeführt.

3.4.o. Mikrokinematographie auf 16 mm-Film:

Zur besseren Auswertung und Dokumentation der auf Super-8-Film erfaßten lichtmorphologischen Zellveränderungen wurde unter mikroskopischer Kontrollbeobachtung die Bolex H 16 EL (s. Abschnitt 2.1.4.) eingesetzt. Die Einzelaufnahmen erfolgten im 1 min-Abstand über einen Zeitraum von 8o min; danach im Stunden-Rhythmus bis 16 h. Benutzt wurde Kodak Eastmann 4-x SW Negativ Film 16 mm (27 DIN für Kunstlicht) ; die Entwicklung und Fixation erfolgte mit Ilford-Microphen-Entwickler bzw. Ilford-IF-2-Fixiersalz in der Kippdose. Die so entstandenen Negative wurden auf Ilford-Photographic-Paper-Gradation-2 (unter Verwendung entsprechenden Entwicklers und Fixiersalzes) abgezogen (3). Zur Beschreibung der aufgetretenen morphologischen Veränderungen siehe Abschnitt 3.2.o. und Bildtafeln.

3.5.o. Elektronenmikroskopische Untersuchungen:

Der sowohl zunehmende als auch abnehmende Calciumgehalt bei gleichbleibenden lichtmorphologischen Veränderungen (s. Abschnitte 3.2.o., 3.4.o.) veranlaßte uns die Zellen auch elektronenoptisch zu untersuchen. Die Probengewinnung und die Calciummessungen er-

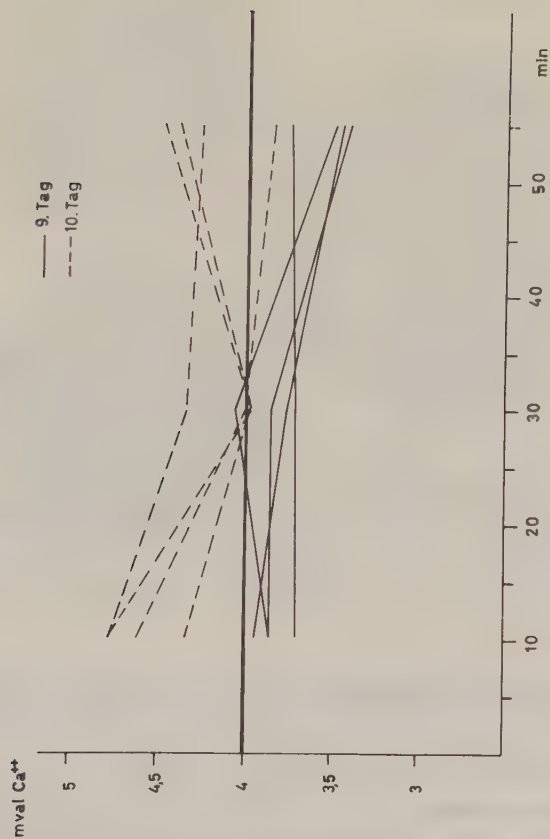


Abb. 11: Calciummessungen bei AH 130 am 9. und 10. Tag nach Tumortransplantation

folgten aus gleichkonzentrierter Zellaufschwemmung (s.o.) nach 10 min, 30 min und 55 min; diese Zeitpunkte bieten die deutlichsten Divergenzen bzw. Konvergenzen in puncto Calciumgehalt des Nährmediums (s.Abb. 7). Die Aszitesflüssigkeit wurde den Ratten am 9. und 10. Tag nach Tumortransplantation entnommen. Dabei zeigte sich eine Tendenz zum Calciumabfall am 9. Tag und am 10. Tag ein Anstieg.

Die Proben wurden wie folgt fixiert: Zugabe eines Gemisches aus 2% Formaldehyd und 2,5% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer pH 7,4 für 1 bis 4 Stunden bei Zimmertemperatur. Darauf erfolgt eine Nachfixierung in 1% OsO_4 (pH 7,4), Entwässerung in aufsteigendem Alkohol und Einbettung in Epon^R 812 nach Passage durch Propylenoxid.

Bei der Auswertung der Bilder ergab sich folgendes:

3.5.1. Tendenz zum Calciumabfall: (Abb. 12 - 14)

Zellmembran: Die Zellen behalten ihre typischen Unregelmäßigkeiten an der Zelloberfläche in Form von villusartigen Ausstülpungen variabler Länge und weitgehend konstanten Durchmessers bei. Ihre optische Dichte erscheint etwas höher als die des Zytoplasmas (35, 71). Die Grenze von Membran zu Zytoplasma ist nicht unterbrochen.

Zytoplasma: Einige Mitochondrien sind unregelmäßig im Zytoplasma verteilt. Sie sind von kleiner rundlicher bis langgestreckter Gestalt. Die äußere Doppelmembran ist deutlich, eine Cristae-Struktur nur verwaschen sichtbar. Nicht selten findet man ein bis mehrere rundliche Lipidtropfen. In einigen Zellen sind Bündel von Mikrofilamenten sichtbar.

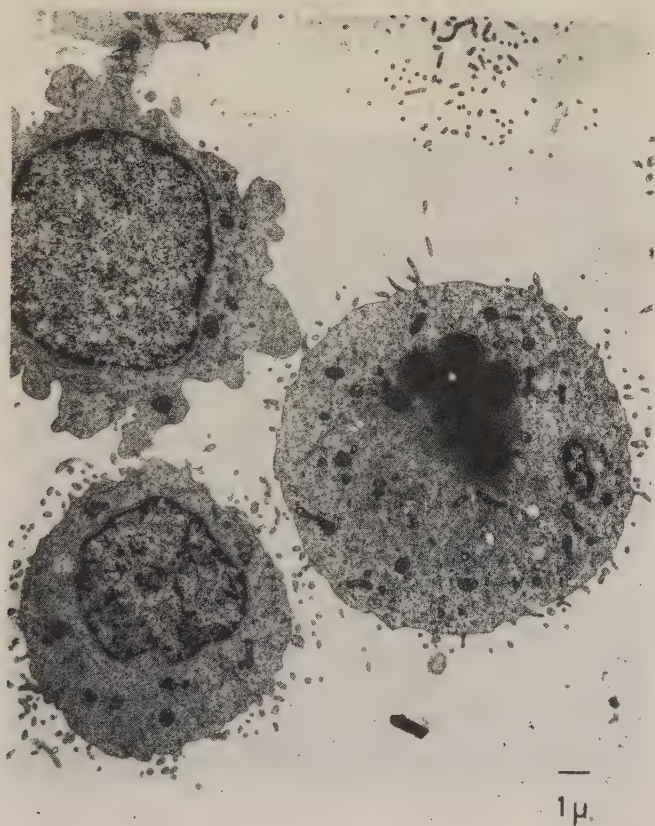


Abb. 12: In der Mehrzahl intakte Zellen bei Calciumabfall

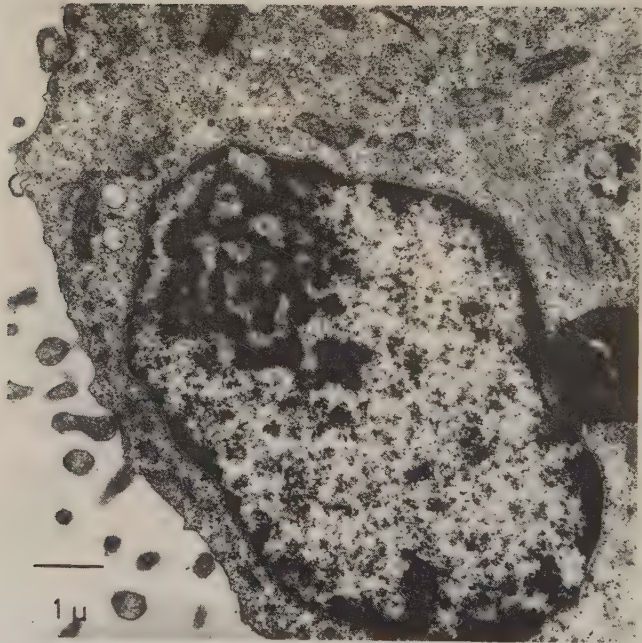


Abb. 13: Kern von intakter Zelle bei Calciumabfall

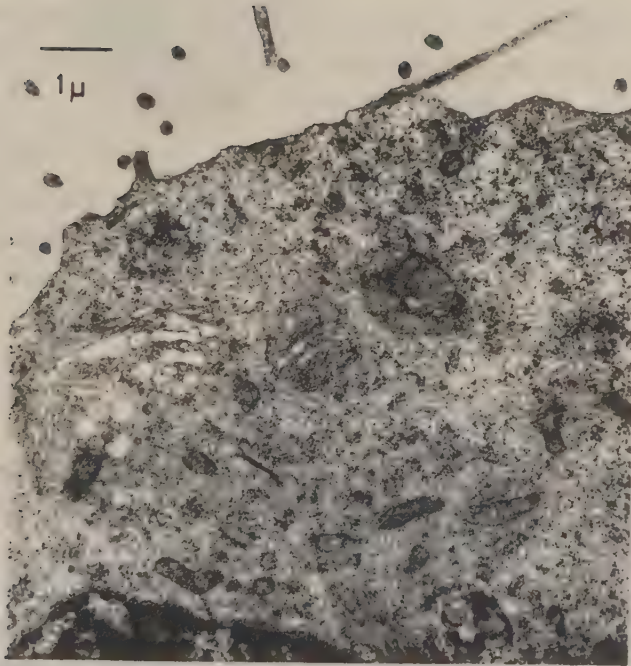


Abb. 14: Organellen intakter Zellen bei Calciumabfall

Golgifeld: Häufig werden halbrunde bis hufeisenförmige Golgikomplexe gefunden, die aus Stapeln von 3 bis 5 Golgizisternen und zahlreichen Vesikeln von wechselnder Größe bestehen.

ER: Kurze Profile von ER werden in allen Partien des Zytoplasmas gefunden, dazwischen liegen freie Polysomen, hauptsächlich freie Ribosomen.

Kern: Unregelmäßige rundliche bis ovale Form mit diffus verteiltem Heterochromatin. Die Kernmembran ist intakt und besteht aus einer zirkulären Zisterne des ER. In einzelnen Zellkernen wird ein deutlicher Nucleolus mit ausgeprägter Nucleonemata-Struktur beobachtet.

3.5.2. Tendenz zum Calciumanstieg (Abb. 15 - 16)

Zellmembran: Die typischen Mikrovilli auf der Oberfläche der Zellen sind vermindert bzw. ganz verschwunden; dafür sind plumpe kolbenförmige Ausstülpungen ersichtlich, die breit mit dem Zytoplasma in Verbindung stehen können oder in einzelnen Fällen nur eine schmale stielförmige Brücke zum Zytoplasma haben. In späteren Stadien können in der Umgebung der Zellen ganze Zytoplasmasequester gefunden werden; die restlichen Zellen erscheinen an der Oberfläche glatt mit einem reduzierten Zelleib.

Zellorganellen: Hierbei (ER, Ribosomen, Golgiapparat und Mitochondrien) erscheinen keine ersichtlichen Veränderungen im Frühstadium. Später sieht man im Zytoplasma rundliche Vakuolen mit cristaartigen Innenstrukturen; es könnte sich um stark geschwollene Mitochondrien handeln.

Kern: Er ist unregelmäßig geformt, langgestreckt und segmentiert. Im Chromatin finden sich keine Veränderungen.

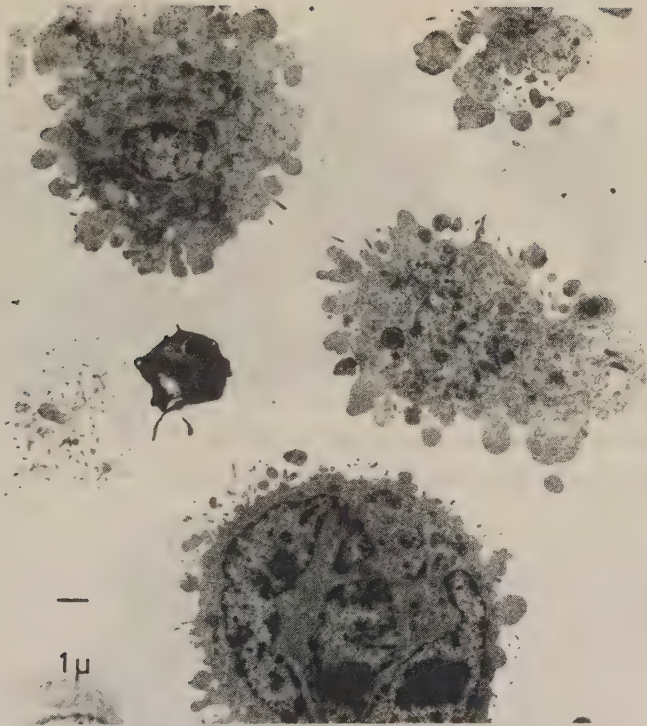


Abb. 15: Veränderte Zellen nach 10 min bei Calciumanstieg

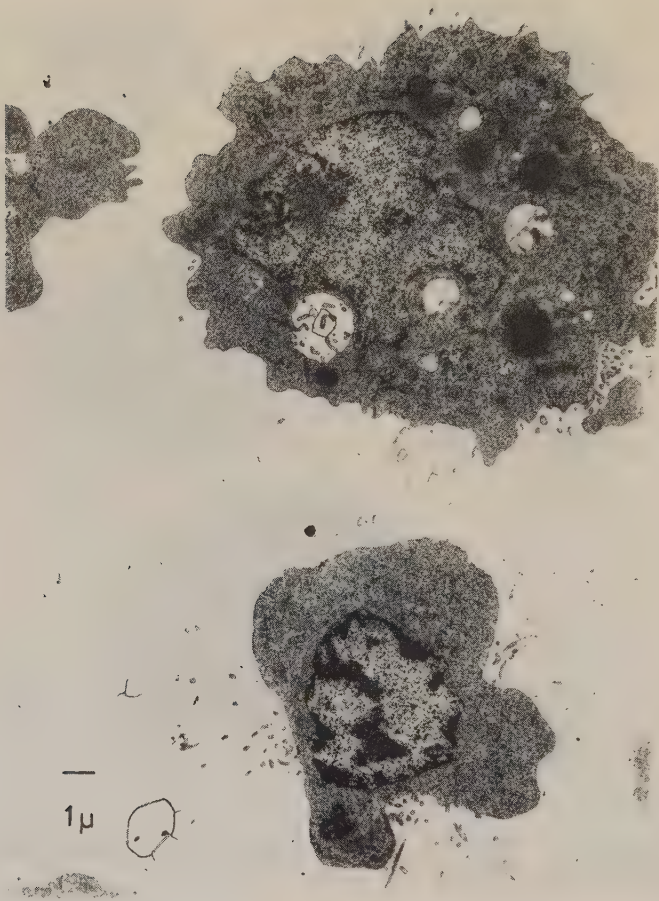


Abb. 16: Veränderte Zellen nach 55 min bei Calciumanstieg

4.o.o. Diskussion

Die lichtmorphologischen Zellveränderungen lassen auf irreversible Schädigungen schließen. Dies wurde durch Langzeitbeobachtungen bestätigt (31). Es läßt sich feststellen, daß "un-physiologisch hohe" Calciumkonzentrationen (4 mVal/l Medium) im Nährmedium Yoshida-Aszites-Hepatom-Zellen (Stamm 13o) in ihrem morphologischen Erscheinungsbild beeinflussen.

Die durchgeführten Calciummessungen in der Zellsuspension geben die Wechselwirkungen zwischen den Tumorzellen und dem Calcium-Gehalt des zugesetzten Nährmediums wieder. Wie eingangs erwähnt, wurde, um bei einfachen Modellverhältnissen zu bleiben, auf die Zugabe von Proteinen und anderen Substanzen verzichtet (2.2.2., 64, 14, 11).

Durch die Calciumanstiege bzw. -abfälle in der Suspensionslösung können zwar gewisse Rückschlüsse auf eine Abgabe bzw. Aufnahme von Calcium der Einzelzellen getroffen werden, doch läßt die biologische Individualität verschiedener Tumortransplantate selbst bei Entnahmen aus demselben Tier keinen Vergleich der Absolutwerte, sondern nur Tendenzen zu (75). Diese könnten, wie einige Beobachtungen (s. Abb. 11) zeigen, eventuell vom Zellzyklus bzw. vom Alter der Tumorzellen abhängen (24, 2o, 18). PERRIS (53) beschrieb, daß ein Anstieg des die Zellen umgebenden Calciums an verschiedenen Säugetier- und Insektenzellen deren Mitoserate beschleunigt. Die Phasen des Zellzyklus bei AH 13o werden von GAETANI et al. folgendermaßen angegeben: $G_1 = 19$ h, $S = 24$ h, $G_2 = 65$ min und die Mitose = 2 h (Prophase 31 min, Metaphase 6o min, Anaphase 7 min, Telophase 11 min). Dabei ist G_1 die Phase mit der größten zeitlichen Streuung (24). Dadurch läßt sich auch die Variationsbreite bei Calcium-

Messungen am selben Tag (s. Abb. 11) deuten.

(Es wurde Aszitesflüssigkeit zum Transplantationstermin aus einer Ratte auf vier weitere Tiere übertragen; diesen vier Tieren wurde jeweils am 9. und am 10. Tag Aszites entnommen und auf beschriebene Art untersucht). Untersuchungen am Seeigel-Ei (32) und in Muskelzellkulturen (49) ergaben ähnliche Resultate.

Weiterhin wären Schwankungen in der Proteinsyntheserate zu beachten mit einer bzw. durch eine Erhöhung des intrazellulären Calcium, was wiederum in Wechselwirkung zu anderen Ionen wie Natrium und Kalium stünde. Die angedeuteten Möglichkeiten brauchen einander nicht auszuschließen, sondern können kombiniert auftreten und sich sogar ergänzen (27).

Im Gegensatz zu Untersuchungen an anderen Tumorzellen (durchgeführt von Schüte am hiesigen Institut an AH 602) zeigen die Calciumwerte in einer Zellsuspension des AH 130 in bestimmten Zeitabständen einheitlichere Erhöhung und Erniedrigung.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigen die lichtmikroskopischen Beobachtungen und die daran anschließenden Überlegungen weitgehend. Beim Calciumabfall wurden überwiegend morphologisch intakte Zellen gefunden; beim Calciumanstieg zeigten sich hauptsächlich Oberflächenveränderungen in Form von Membranschädigung, plumpen pseudopodienartigen Plasmaausstülpungen (der Vesikelbildung und Abschnürung im lichtmikroskopischen Bild entsprechend) und einer Abnahme der Kern-Plasma-Relation zu Ungunsten des Plasmas. Der eingetretene Verlust der Mikrovilli läßt nach NICOLSON (52) u.U. auf eine Störung des mikrotubulären und mikrofilamentösen Systems schließen; dies könnte auch durch die geschwollenen Mitochondrien in späteren Untersuchungsstadien angedeutet werden.

Veränderungen an Membranen, auch an Mitochondrien und Mikrosomen wurden auch von DAVID (7) bei pathologischen Störungen des Calciumstoffwechsels beschrieben.

5.o.o. Zusammenfassung

Es wurde eine Methode entwickelt zur kombinierten biochemisch-morphologischen Untersuchung an Einzelzellen. Dabei wurde der Einfluß von "unphysiologisch hohen" Calciumkonzentrationen (4 mVal Ca^{++} /l Medium) auf Yoshida-Aszites-Hepatom-Tumorzellen Stamm 13o untersucht. Die lichtmorphologischen Beobachtungen in einer Durchströmungskammer erfolgten durch ein Mikroskop "umgekehrter Bauweise". Gefilmt wurde mit einer Super-8-Kamera (zur Erstorien-tierung) und später mit einer eigens dafür umgebauten 16 mm Film-kamera.

Es konnte ein Effekt auf die Struktur der Zellen in Form von Einschnürungen an der Oberfläche, Vesikelbildung und Bläschenausstoßung aus dem Zytoplasma nachgewiesen werden. Kontrollbeobachtungen an "physiologischeren" Nährmedien ergaben diese Effekte nicht oder nur in erheblich späterem Zeitraum.

Simultan dazu wurde das ionisierte Calcium mit Hilfe einer ionenselektiven Calcium-Scheiben-Durchfluß-Elektrode in bestimmten Zeitabständen gemessen. Zur Kontrolle erfolgten Messungen von gleichkonzentrierter Zellaufschwemmung in Reaktionsgefäßen. Die Meßergebnisse aus den Durchströmungskammern und aus den Vergleichsgefäßen entsprachen einander. Sie zeigten sowohl Anstiege als auch Abfälle im Calciumgehalt des Nährmediums (eventuell abhängig vom Zellcyclus). Die größten Divergenzen sind im Bereich von 1o min und 55 min; die Konvergenzen bei 3o min.

Elektronenoptische Untersuchungen zeigten bei verminderten Calciumwerten intakte Zellen. Bei Calciumanstiegen stellten sich Zellen dar, die die hauptsächlichsten Veränderungen an der Ober-

fläche erkennen ließen in Form von Membranschädigungen, plum-
pen pseudopodienartigen Plasmaausstülpungen und Plasmaausstoßun-
gen mit einer Abnahme der Kern-Plasma Relation zu Gunsten des
Kernes. In späteren Stadien trat ein völliger Verlust der Mikro-
villi auf. Anfänglich erscheinen die Organellen ohne ersichtliche
Veränderungen, später kommt es zur Entwicklung rundlicher Vakuolen
im Zytoplasma, die als geschwollene Mitochondrien gedeutet werden
können.

Insgesamt laufen die morphologischen Veränderungen auf zunehmende
irreversible Schädigung der Zellen hinaus.

6.o.o. Literaturverzeichnis

1. AX, W. Mikrokinematographische Beobachtungen
KABOTH, U. an kultivierten Mäuse-Omenten; Nachweis
FISCHER, H. gebildeter Antikörper,
Z. Naturforsch. 21b, 782-788 (1966)
2. AX, W. The behavior of lymphocytes in the pro-
MALCHOW, H. cess of target cell destruction in vitro
ZEISS, I. Exp. Cell Res. 53, 108-116 (1968)
FISCHER, H.
3. BECKER, F. Persönliche Mitteilungen
4. BENISCH, H. Über das Vorkommen von Hydroxyprolin in
Ehrlich-Aszites-Tumorzellen (kultiviert
in vivo und in vitro)
Inaug.Diss.Medizin, Marburg 1976
5. BOLEX GmbH Schaltplan für Bolex HR 16 und persön-
liche Mitteilungen
6. CURTIS, D.R. Studies in physiology,
Mc INTYRE, A.K. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-
New York 1965
7. DAVID Zellveränderungen bei Störung des Kal-
ziumstoffwechsels
Verlag nicht bekannt
8. DAVIES, M. Funktion biologischer Membranen,
Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1974

9. DETERMANN H. Das Mikroskop und seine Anwendung
LEPUSCH, F. Leitz 512-69, Firmenschrift
10. DIETLE, H. Interferenzkontrast: Ein neues Mikrover-
fahren
Kosmos 71, 389-291 (1975)
11. FEO, F. Further Observations on the Effects of
BONELLI, G. et al. Trypsin on the Volume and Functions of
Mitochondria Isolated from Normal Liver
and AH-130 Yoshida Ascites Hepatoma,
Cancer Res. 33, 1804-1812 (1973)
12. FERENCZ F. A phase contrast Cinematographic Analysis
NARDONE R.M. of elevated Tension on Cell Dynamics
in Strain L Cells
Exptl. Cell Res. 63, 277-284 (1970)
13. FERRENDELLI, J.A. Influence of Divalent Cations on Regu-
RUBIN, E.H. et al. lation of cyclic GMP and cyclic AMP Levels
in Brain Tissue
J. Neurochemistry 26, 741-748 (1976)
14. FISCHL, J. Modified "Calcium Base Reagent" for Simul-
SCHWARTZ, F. taneous Determination of Serum Calcium and
Inorganic Phosphate with the "Autoanalyser"
Clin.Chemistry 18/11, 1430-1431 (1972)
15. FRANKE, H. Phasenkontrast Hämatologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1954
16. FREED, J.J. Cell Culture Perfusion Chamber: Adaption
for Microscopy of Clonal Growth,
Science 140, 1334-1335 (1963)

17. FUCHS, C. Bestimmung des ionisierten Calciums
PASCHEN, K. im Serum mit einer ionenselektiven Durch-
SPIECKERMANN fluBelektrode: Methodik und Normalwerte,
v. WESTBERG, C. Klin.Wochenschrift 50, 824-832 (1972)
18. GAETANI, M. La proliferazione cellulare dell'epatoma
SILVESTRINI, R. ascite AH 130 di Yoshida,
BELLINI, O. Sperimentale 114, 293 (1964)
19. GALLI, P. Extracellular calcium and the organisation
BRENNNA, A. of tight junctions in pancreatic acinar
DE CAMILLI cells
MELDOLESI, J. Exptl.Cell Res. 99, 179-183 (1976)
20. GELFANT, S. Aging: Noncycling Cells and Explanation
Science 178, 357-361 (1972)
21. GERICKE, D. Persönliche Mitteilungen und Arbeitsvor-
lage für Tumortransplantation AH 130
22. GERICKE, D. Methoden zur Testung von Substanzen auf
zytostatische Wirksamkeit,
Münchener Med.Wochenschrift 18, 833-838
(1973)
23. GERICKE, D. Therapeutische und experimentelle Fibrino-
lyse;
Int.Symp. vom 29.Sept. bis 1.Okt. 1967 in
Ulm (Donau), Sonderdruck: F.K. Schattauer-
verlag Stuttgart-New York (1969)
24. GERICKE, D. Tumor-Chemotherapie und Zellzyklus,
Deut.Ärzteblatt 17, 1197-1202 (1975)

25. GOLDBERG, D.M. Influence of Demographic Factors on Serum
HANDYSIDE, A.J. Concentrations of Seven Chemical Consti-
WINFIELD, D.A. tuents in Healthy Human Subjects,
Clin.Chem. 19/4, 395-402 (1973)
26. GONZALES SISTER P. Cyclic Nucleolar Changes During the Cell
NARDONNE, R.M. Cycle,
Exptl.Cell Res. 50, 599-615 (1968)
27. GÜNTHER, T.H. K-Transport und Stoffwechsel von Mg-arm
AVERDUNK, R. gewachsenen Yoshida-Ascitestumorzellen,
Z.klin.Chem. u.klin. Biochem. 8, 621-625
(1970)
28. GUNDLACH, H. Zur Anwendung der Interferenzkontrast-
HEUNERT, H.H. Mikroskopie in der Biologie,
Microscopia Acta 76, 305-315 (1975)
29. GUNDLACH, H. Mikrokinematographie mit dem Mikroskop
HEUNERT, H.H. "Axiomat"
Res.Film 9, 30-36 (1976)
30. HEUNERT, H.H. Persönliche Mitteilungen
31. HILWIG, I. Prüfung chemotherapeutischer Substanzen
auf Verursachung reversibler und irrever-
sibler Zellschäden am Modell der Gewebe-
kultur
Zeitschr. für Krebsforschung 65, 513-523
(1963)

32. HOLLINGER, T.G. "Cleavage" and Cortical Granule Breakdown
SCHUETZ, A.W. in Rana Pipiens Oocytes induced by Direct
Microinjection of Calcium,
Journ. Cell Biol. 71, 395-401 (1976)
33. KELLNER, L. Pharmacology of 1,6-dideoxy-dulcitol and
NEMETH, L. its Cytostatic Effect on Transplantable
SUGAR, J. et al. Tumours,
übersandt von Prof. Nemeth, Onkopathologie
Budapest/Ungarn
34. KRISHAN, A. Time-Lapse ultrastructure studies on the
reversal of mitotic arrest induced by
vinblastine sulfate in Earle's L cells
J. Nat.Cancer Inst. 41, 581-595 (1968)
35. LAPES, K. An Electron Microscope Study of NK Lymphoma
MERCER, E.M. Cells and the Changes Produced by two
Cytostatic Drugs,
Cancer Res. 23, 676-681 (1963)
36. LEITZ Druckschrift 521-23a, Durchlicht-Interfe-
renzeinrichtungen
37. LEITZ Druckschrift 55o-37aR, Interferenz-Kon-
trast Einrichtung T
38. LEITZ Firmenschrift 52o-42, Leitz-Diavert:
Mikroskop-System umgekehrter Bauart für
alle Untersuchungsmethoden
39. LEITZ Druckschrift 54o-41R und Ergänzung. Mikro-
kinematographische Einrichtung mit Lei-
cina Special

62. SCHINDLER, J.G. 1)Scheibenelektrode,
RIEMANN, W. 2)Calciumselektive Scheiben-Elektrode
für Durchflußmessungen
Biomed. Technik 20, 75-77 (1975)
63. SCHÜTE, U. Persönliche Mitteilungen und Inaug.Diss.
Medizin Marburg 1977 in Vorbereitung
64. SEAMONDS, B. Determination of Ionized Calcium in Serum
TOWFIGHI, J. by Use of an Ion-Selective Electrode
ARVAN, D.A. Clin.Chemistry 13, 155-160 (1972)
65. SIERING, H. Zytomorphologische Vitaluntersuchungen
am Mäuse Aszites Carcinom,
Naturwiss. 39, 267-268 (1952)
66. STEFFEN, Ch. Ionisiertes Calcium im Pankreassaft des
SCHINDLER, J.G. et al. Hundes: Fortlaufende Registrierung mit
einer Scheibenelektrode,
Biomed. Techn. 21, 188-189 (1976)
67. STEINBACH, K. Persönliche Mitteilungen
68. STEINBACH, K. Leicina Special - die Super-8-Filmkamera
für die Mikrokinematographie,
Leitz-Mitt. Wiss. u. Technik 6, 73-77
(1974)
69. STOLL, P. Gynäkologische Vitalcytologie in der
Praxis,
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-
New York 1969

70. TEDESCHI, H. Cell Physiology: Molecular Dynamics,
Academic Press New York and London 1974
71. THREAGOLD, L.T. The Ultrastructure of the Animal Cell,
Pergamon Press 1 st Edition 1967
72. THOMPSON, L.H.
HUMPHRY, R. Proliferation Kinetics of Mouse L-P59
Cells Irradiated with Ultraviolett
light: A time-lapse photographic study
Radiat. Res. 41, 183-201 (1970)
73. VAHAR-MATIAR, H. Korrelationen zwischen Magnesium und
anderen Serumelektrolyten bei neuropsy-
chiatrischen Erkrankungen,
Med.Welt 27, 2501-2505 (1976)
74. WILLMER Cells and Tissues in Culture: Methods,
Biology and Physiology,
Academic Press, London-New York, 1965 ff
75. WRBA, H. Vitalitätsbestimmung durch markierte
Verbindungen
Z.f.Zellforsch. 53, 90-140 (1960)
76. YOSHIDA, T. Zelluläre Multizentrität der Krebsent-
stehung, Studien mit dem Aszites-Hepatom
der Ratte.
Deutsche Med. Wochenschrift 46, 2229-
2238 (1963)
77. ZEISS Druckschrift G 41-130/I-d, Forschungs-
mikroskop Standard WL

Die Gelegenheit zur Durchführung dieser Arbeit und die Überlassung des Themas verdanke ich Herrn Prof. Oepen.

Der elektronenmikroskopische Teil der Untersuchung wurde auf Veranlassung und unter Aufsicht von Herrn Prof. Kern (Inst.f. Cytopathologie) ausgeführt, dem ich auch für seine Beratung bei der Auswertung der Befunde danken möchte. Herrn Dr.Dr. Schindler (Inst.f. Angewandte Physiologie) und Fräulein Schüte (Inst.f.Humangenetik) spreche ich meinen ganz besonderen Dank aus für ihre unermüdliche Unterstützung beim Einsatz der Scheibenelektrode für Calciummessungen.

Eine wesentliche Hilfe bedeuteten auch die Gespräche mit Prof. Ax (Behringwerke Marburg), Fotografenmeister Becker (Hygiene-Inst.), Dr. Coulon (Firma Leitz-Wetzlar), Ing. Heunert (Inst.f.Wiss. Film Göttingen), Ing. Kranz (Hamburg), Dr. Müller (Inst.f. Elektronik), Werkstattmeister Riemann (Inst.f. Angewandte Physiologie), Dr. Scheel (Firma Fresenius KG Bad Homburg), Dr. Schneider (Inst.f. Humangenetik) und Herrn Steinbach (Firma Leitz-Wetzlar).

Lebenslauf

Am 29.7.1950 wurde ich, Ekkehard Karl Ludwig Vollmer, in Freiburg/Br. als ältester Sohn des Kinderarztes Dr.med. Otto Vollmer und dessen Ehefrau Maria-Luise, geb. Bappert, geboren.

Von 1957 an besuchte ich die Volksschule in Freiburg-Littenweiler; danach das Rotteck-Gymnasium in Freiburg/Br. bis 1967. Im Schuljahr 1967/68 erhielt ich ein Stipendium des American-Field-Service für einen Schulbesuch in USA. Auf der Northwestern-High-School in Kokomo/Indiana bestand ich 1968 die Schulabschlußprüfung. 1969 legte ich am Rotteck-Gymnasium in Freiburg/Br. das Abitur ab.

Im Sommersemester 1970 begann ich das Studium der Medizin in Marburg/Lahn. 1971 legte ich das Vorphysikum, 1973 das Physikum ab. Die ersten beiden klinischen Semester studierte ich an der Universität Wien. Die folgenden Semester absolvierte ich in Marburg, wo ich am 14. Januar 1977 mein medizinisches Staatsexamen beendete.

Seit 1. Februar 1977 arbeite ich als Medizinalassistent am Institut für Humangenetik und Humangenetische Poliklinik der Universität Marburg/Lahn.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren
Professoren und Dozenten

an der Universität Marburg/Lahn:

Amon, Arndt, Aurich, Aziz, Braasch, Buchholz, Castenholz,
Dennicke, Dimroth, Dittrich, Dombrowski, Eißner, Eschenbach,
Friederich, Gerdes, Graul, Grundner, Habermehl, Haberich,
Hamm, Hamelmann, Hardewig, Hensel, Hess, Hildebrandt, Hilger-
mann, Hort, Huch, Ihm, Jacob, Joseph, Kaffarnik, Karlson, Klaus,
Kleinsasser, Kern, Koecke, Koransky, Lauer, Lauth, Linneweh,
Ludwig, Lütcke, Maroske, Martini, Oepen, I., Oepen, H., Petry,
Portig, Remschmidt, Richter, Rodeck, Rohen, Rupec, Schaumlöffel,
Siegel, Siegert, Schmitz-Moormann, Schneider, Sodomann, Straub,
Thoenes, Troidl, Walcher, Wehrmayer, Welge-Lüßen, Wendt, Willen-
bockel.

An der Universität Wien:

Asperger , Berner, Chiari, Deutsch, Fellingner, Flamm, Gitsch,
Holzner, Husslein, Janisch, Kaiser, Kucsko, Langer, Lindner,
Navratil, Novotny, Obiditsch-Mayer, Palmerich, Reisner, Rocken-
schaub, Slezak, Speiser, Tappeiner, Thalhammer.

